

特集①

ゲノム構造解析技術の研究開発の必要性

ライフサイエンス・医療ユニット 島田 純子^{*}
茂木 伸一

1. はじめに

2003年4月14日にヒトゲノムの完全配列を解読したとしてヒトゲノムプロジェクトの終了が宣言された。ヒトゲノムプロジェクトは、ヒトゲノムの全配列解読を目標とするもので、1980年代半ばに提唱されたが、その当時の解析技術では全配列解読には膨大な時間を要することなどから、実現性は乏しいと考えられていた。しかし、その後、ヒトゲノム研究に対する動きが次第に活発となり、1990年に国際ヒトゲノムプロジェクトが米国主導で本格的に開始されることとなった。プロジェクト開始当

初の計画では、ヒトゲノムの全配列（約30億塩基対）を解読することや全遺伝子（約3万個）を同定すること等を2005年までに終了する予定であったが、この4月に全配列の完全解読が終了したとの宣言がなされたのである。その主たる要因として、解析装置の能力が急速に向上したことがあげられている¹⁾。

このヒトゲノムプロジェクトを経て、ゲノム構造解析技術がここ数年間で急速に進展したことや、配列解析装置が研究に用いる機器として一般に普及したことなどか

ら、ゲノム構造解析技術は、すでに成熟した技術であるとの認識もある。しかしながら、これからのポストゲノム研究の時代においては、「より速く低コストで解析する」ことが、さらに求められるようになってきている。従来の技術の延長線上だけではこういった要望に応えるには限界があるといわれており、新たな技術の導入が期待されているところである。

本稿では、このような状況にあるゲノム構造解析技術の研究開発の現状と、研究開発の推進の必要性について述べる。

2. ゲノム構造解析と機能解析

ゲノムの解析には、ゲノム構造解析とゲノム機能解析がある。

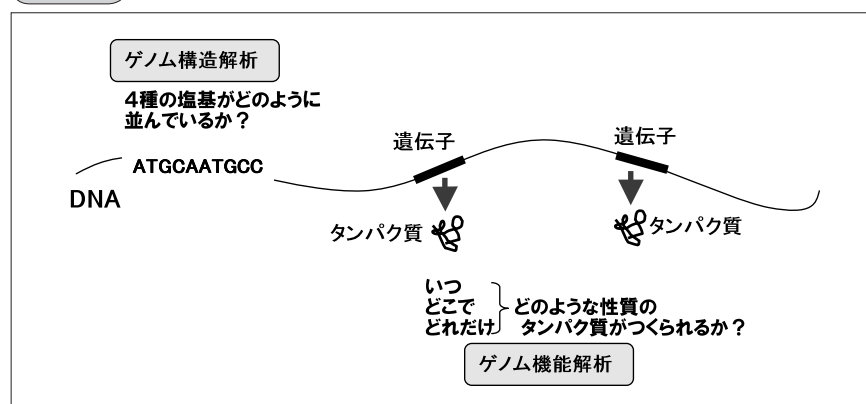
ゲノム構造解析とは、デオキシリボ核酸（DNA）の4種の塩基の配列を明らかにすることである。ゲノムとは、遺伝情報の全体像のことであり、ヒトの場合、24種類の染色体（22種類の常染色体とX・Yの2種類の性染色体）に含まれている。遺伝情報を担っているのは、DNAであり、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類の塩基がその構成要素であり、全配列を合計すると約30億塩基対ある。DNAの配列には個人差があり、遺伝的多型と呼ばれている。ゲノム構造の解析には、DNA配列を端から読

みとっていく方法と、ある既知のDNA配列と比較してその違いを見る方法がある。

ゲノム機能解析とは、ゲノムの配列情報とその表現型（phenotype）

との対応を明らかにすることである。すなわち、タンパク質をつくる情報を保持している遺伝子やそれを調節する領域の位置を探索し、その機能を同定することなどである。

図表1 ゲノム構造解析と機能解析



科学技術動向センターにて作成

3. ゲノム構造解析技術の進展

ゲノム構造解析技術としては、DNA を端から読みとっていく方法 (DNA 塩基配列決定技術) と、基盤上に固定化した DNA 配列との結合性を利用して、固定化した配列との差異を検出する方法がある。

一本鎖 DNA の塩基配列を決定する原理は、1977 年に、Frederick Sanger によるサンガー法^①と、Allan Maxam、Walter Gilbert によるマキシム・ギルバート法の 2 つの方法がほぼ同時に発表された。この当時は、手作業と放射線検出により DNA 塩基配列決定が行われていたため、1 人の実験者が 1 年で 1,000 塩基程度を決定するのが限界だった²⁾。自動化するにはマキシム・ギルバート法に比べてサンガー法の方がより簡単であったことなどから、次第にサンガー法がよく使われるようになっていった。

その後、1982 年に、東京大学の和田昭允が自動塩基配列決定装置の開発を提唱し、このための要素技術の開発が開始された。1986 年に、Leroy Hood および Lloyd Smith らが最初の自動塩基配列決定装置を発表、1987 年に Hood の原理に基づく最初の自動塩基配列解析装置が Applied Biosystems inc. から販売され始めた。さらに、1990 年に、Lloyd Smith、Barry Karger、Norman Dovichi の 3 グ

図表 2 ゲノム関連技術の開発史

| | | |
|------|--------------------------------------|--|
| 1953 | 二重らせん構造の発見 | J. Watson and F. Crick |
| 1972 | DNA の組換え技術の開発 | P. Berg and S. Cohen |
| 1977 | DNA シークエンシング法の開発 (サンガー法、マキシム・ギルバート法) | F. Sanger, A. Maxam, and W. Gilbert |
| 1980 | RFLP によるマッピング提唱 | D. Botstein, R. Davis, M. Skolnick, R. White |
| 1982 | 塩基配列決定自動化システム提唱 | A. Wada |
| 1984 | パルスフィールドゲル電気泳動法の開発 | C. Cantor, D. Schvartz |
| 1985 | PCR 法の開発 | K. Mullis |
| 1986 | 自動シークエンサーの開発 PCR のための耐熱性酵素 | L. Hood, L. Smith Mullis, K. Saiki |
| 1987 | YAC (人工酵母染色体) 自動シークエンサー市販 | D. Burke, M. Olson, G. Carle Applied Biosystems inc. |
| 1989 | STS を使ったマッピング | Olson, Hood, Botstein, Cantor |
| 1990 | キャピラリー電気泳動の開発 | Karger, Smith, N. Dovichi |
| 1992 | BAC (人工バクテリア染色体) の開発 | M. Simon |
| 1993 | キャピラリーアレイ電気泳動 | H. Kambara |
| 1995 | DNA マイクロアレイ | P. Brown |
| 1996 | DNA チップ市販 | Affimetrix |
| 1997 | キャピラリー DNA シークエンサー市販 | Molecular Dynamics |
| 1998 | キャピラリー DNA シークエンサー市販 | PE Biosystems Inc. |

徳島大学薬学部馬場嘉信教授提供資料および参考文献³⁾ をもとに科学技術動向研究センターにて作成

ループがキャピラリー電気泳動に基づくシークエンサーを、1992～3 年に Richard Mathies および日立製作所の神原秀記らのグループがキャピラリーアレイ電気泳動に基づくシークエンサーを開発した。この装置は、1997 年に Molecular Dynamics から、1998 年に PE Biosystems Inc. から市販され始めた³⁾。この装置が、現在、最も一般的に用いられているもので

ある。

キャピラリー DNA シークエンサーでは、サンプルの分析・検出・解析が自動化されている。サンプル分析過程である電気泳動をキャピラリー (毛細管) 中で行うことにより、高速性と分解能向上を実現したものである。現在の装置は、1 日あたり 748,800 塩基 (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer は 48 本のキャピラリーを装備している。解析プロトコル Standard を用いた場合キャピラリー 1 本による解析で約 650 塩基の長さの配列を一度に解読することができるが、この操作に約 1 時間かかる) も解読できるまでになっている⁴⁾。以上のように、塩基配列解析技術はサンガー法に基づいた技術革新が進み、この間に解析能力が飛躍的に向上した。

一方、SNP (一塩基多型、single

用語説明

①サンガー法

一本鎖 DNA の塩基配列を決定する方法。一本鎖 DNA に相補的な配列のポリヌクレオチド鎖を、酵素を用いて合成する時に、特定のヌクレオチドの位置で反応を停止させることができることを利用する。相補的な配列を合成するための基質はデオキシリボヌクレオチド (dNTP) だが、そこに少量のジデオキシリボヌクレオチド (ddNTP) を加えておく。酵素は、dNTP と ddNTP を区別せずに伸長中の DNA 鎖に取り込むが、ddNTP が取り込まれた位置で反応が停止する。合成されたポリヌクレオチド鎖を、電気泳動し、その分子量により分離し、検出する。

用語説明

②マイクロアレイと DNA チップ⁶⁾

マイクロアレイ、DNA チップは、ガラスやポリマーの基盤上に特定の DNA を高密度に並べたものである。マイクロアレイは DNA を基盤上に滴下するものである。DNA チップはチップの表面でオリゴヌクレオチドを合成するもので、より高密度に DNA を並べることができる。検査用の DNA 試料を蛍光標識し、基盤上の DNA と反応させると、お互いが相補的であれば二本鎖を形成（ハイブリダイゼーション）する。チップ上のどの DNA に、検査用の DNA 試料が相補的に結合したかは、蛍光検出器とコンピュータ解析により判別する。

nucleotide polymorphism) のような多型の検出や、遺伝子発現のスクリーニングを行うためには、マイクロアレイや DNA チップ^②といった、基盤上に固定した DNA 配列と相補的に結合するかによ

り、固定した配列との差異を検出して配列を調べる方法が用いられている。SNP のような遺伝的な個人差については、時間をかけて配列を端から読みとり、それを既知配列と比較することにより直接調

べることもできる。しかし、マイクロアレイや DNA チップを用いて調べる方がより簡便である。並行して多数の SNP を同時に解析できるという利点があるが、まだ完成された技術ではなく、基盤上への非特異的吸着がノイズになるといった改善すべき問題が残っている。

この技術については、1995 年に、Patrick Brown らが、cDNA プロブをガラス板に貼り付けたマイクロアレイの最初の論文を発表し、1996 年に Affimetrix が商用の DNA チップを作成した³⁾。

4. ポストゲノム研究におけるゲノム構造解析技術

ヒトゲノムプロジェクトが終了して、ポストゲノム研究に突入し、ゲノム構造解析を中心とした研究から、生命現象全般の解明といった研究や、医療・医薬などの分野への応用に進展してきている。

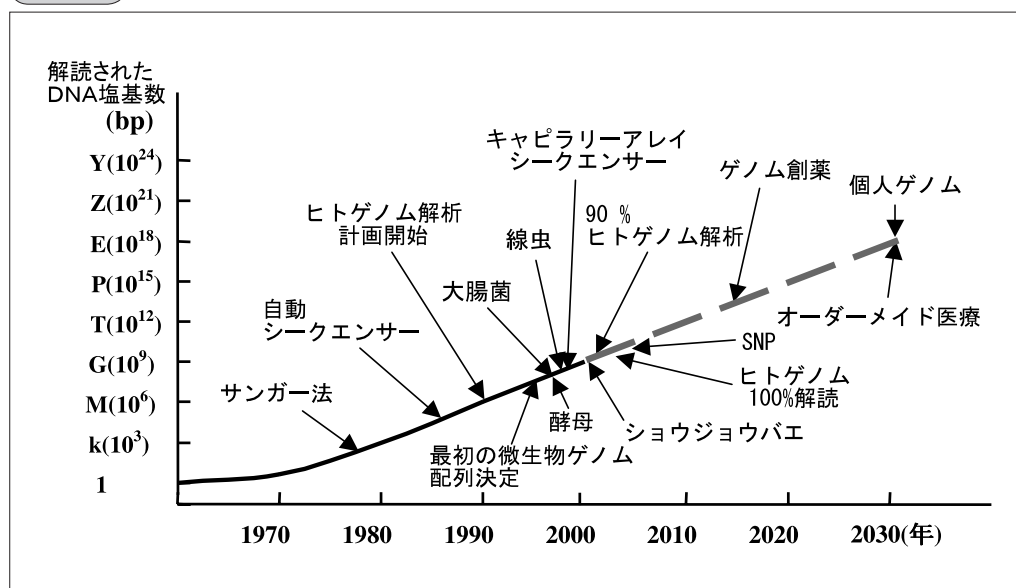
ゲノム構造解析の次のステップとして、DNA 配列情報をもとに、遺伝子の位置や機能を同定するゲノム機能解析、タンパク質の構造や機能の同定、糖鎖研究などの生体分子の研究や、細胞・組織・

個体レベルの研究などが進められている。このような研究においても、関係する部位のゲノムの構造を解析することは必要である。さらに、個々の分子を対象とした研究とは別に、ある時点で細胞に存在する全 mRNA の組成を解析するトランスクリプトーム解析、細胞内の全タンパク質の発現情報解析を行うプロテオーム解析等の網羅的研究の方向性もある。このためには、高効率で解析でき

る技術が要望される。

また、解読されたゲノム配列をもとに機能解析を進め、さらに、その結果を活用するための研究開発も進んでいる。例えば、ゲノム塩基配列には個人差があり、その差異は、疾患のなりやすさや薬剤感受性の遺伝的な素因に対応すると言われている。がんや生活習慣病などの複雑なヒトの疾患に関連した遺伝子群の情報を蓄積して疾患のメカニズム解明を進めて、疾

図表 3 DNA 配列決定ロードマップ



徳島大学薬学部馬場嘉信教授提供資料

患の新しい診断、治療、予防法の開発が目指されている。また、薬剤感受性遺伝子などの特徴を明らかにし、これを利用した医薬品の開発が目指されている。

この基盤として、個人のゲノム塩基配列を統計的に比較し、関連遺伝子の探索を行うことが必要である。疾患や医薬品の作用と関連するゲノム配列を特定するためには、多数のヒトのゲノム配列を統計的に解析する必要がある。ヒトゲノムプロジェクトでは、一通りの塩基配列が明らかにされたに過ぎない。図表 3 に示したように、国際的な塩基配列データベース DDBJ（日本 DNA データバンク、DNA Data Bank of Japan）に登録されている全塩基数は 1970 年代から現在まで指数的に増加しているが、2003 年 3 月現在、約 30 ギガ（ 10^9 ）塩基対（ただし、これはヒトだけでなく、これまで解析さ

れた大腸菌や線虫などをすべて合わせた数）である⁵⁾。ヒト 1 人分の塩基数は 3 ギガ（30 億）塩基であることを考えると、統計的解析のためにはこれまでの実績に比して大量の解析が必要であることがわかる。そのためには、大量のゲノム構造を現在より高い効率で解析できる技術が要望される。

将来的に、ゲノム情報を用いた医療が実現され、臨床応用や個人治療の場面で、例えば検査ツールとして実用化されるためには、さらに解析コストが安いことが求められる。

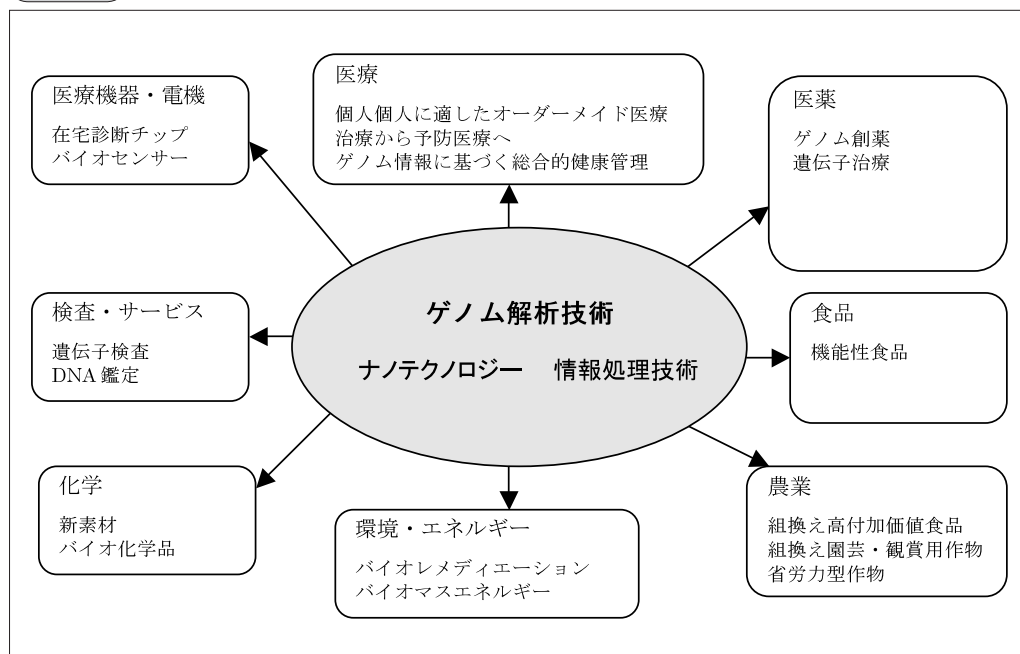
医薬・医療分野以外にも、ゲノム構造解析の必要となる分野は、非常に幅広い。

農業・食品分野では、ゲノム情報に基づいた動植物の品種改良、機能性食品の開発などが進められている。現在までに普及している遺伝子組み換え作物は、除草剤耐

性、害虫抵抗性等の形質を賦与されて、農薬使用の低減や農作業の軽減、収穫量の増加というメリットをもたらしている。現在、より生産効率の良いもの、土壌ストレスに強いもの、栄養価を高めた作物の開発に向けて研究開発が行われている。微生物ゲノムは、バイオ技術の用途として、医薬・医療分野、化成品・化学プロセスや環境分野への適用が考えられている。これを化成品・化学プロセスに活用するとか、微生物を用いて環境汚染を除去して修復する過程（バイオレメディエーション）に用いるなどといったことを考えて、ゲノム情報から新たに微生物の機能を解明する研究が進められている。

従来のものより高効率なゲノム構造解析技術があれば、こういった場面でも研究開発の進展にもたらされる効果は大きい。

図表 4 ゲノム解析技術の応用分野



徳島大学薬学部馬場嘉信教授提供資料をもとに科学技術動向研究センターにて一部改変

5. DNA 塩基配列決定技術に関する最近の研究

DNA 塩基配列決定法の技術改革は、サンガー法の原理に基づいて進み、現在のキャピラリー DNA シークエンサーが生まれてきた。しかし、現在、サンガー法以外の原理を導入した技術の研究開発も進んでいる。これらの技術はまだ研究段階であるが、こういった研究の成果から実用化段階へつながるものも生まれるであろう。以下にこれらについていくつか紹介する。

5 - 1

サンガー法をさらに進めた技術の例

基本的な配列解析技術としてサンガー法を用いて、解析機器を工夫することにより、より高い効率を目指した技術として、質量分析シークエンシングやマイクロチップ・シークエンシングなどが報告されている。

●質量分析シークエンシング

質量分析計は、分子の質量を精密かつ迅速に決定できる装置である。電磁場をもつ真空中にイオン化した分子を導入し、イオン化分子の飛行時間から質量を測定 (TOF/MS) する。1980 年代に、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) やマトリックス支援レーザー脱イオン化法 (MALDI 法) が開発され、タンパク質や DNA 分子のイオン化が可能となり、これらを質量分析できるようになった。DNA の配列決定には、MALDI - TOF/MS 法がよく用いられている。配列決定の原理は、従来から用いられているサンガー法だが、生じた DNA 断片の分離を質量分析計で行うものである。この方法では、DNA 断片の分離と検出・解析が秒単位で終了する

上、サンプルも数 100nl 以下で良い。しかし、現在は 1 回の解析で 100 塩基程度の長さの DNA しか解析できない²⁾。

●マイクロチップ・シークエンシング

ガラスやプラスチック基盤上に微小な溝を作成したマイクロチップ電気泳動デバイスを用いるものである。技術的にはキャピラリー電気泳動と同じ原理である。微小流路は、熱容量が極めて小さいなどの利点から、より高電圧をかけることが可能で、高分解能・高速解析が可能な他、極少量のサンプルで解析することができる。また、チップの作成には半導体技術を用いており、集積化を行って並列化したり、試料調製や検出を 1 チップ上に載せたりすることもできるという利点がある。この概念は、マイクロタス (μ TAS; Micro Total Analysis Systems) またはラブオンチップ (Lab-on-a-chip) と言われている²⁾。現在のところ、DNA を PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で増幅し、その生成物を電気泳動で分子量により分離することが、1 チップ上で数サンプル並列に処理できるようになっている。しかし、DNA 配列解析が可能なチップはまだできていない。

5 - 2

サンガー法によらない技術の例

サンガー法によらない技術として、顕微鏡直読シークエンシングやナノポアシークエンシングなどのように DNA を直接測定することが試みられている。また、DNA チップを用いて DNA の配列を決定する技術も提案されている。

●顕微鏡直読シークエンシング

電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡 (SPM) がめざましく進歩したことにより、DNA を直接観察することもできるようになってきた。そのため、DNA 鎖上の塩基を直接観察して解読する方法も試みられている。いくつかのグループで推進されており、DNA 二重らせんの観察、アデニンとチミンの単一塩基の識別といった報告がある²⁾。

●ナノポアシークエンシング

DNA をその分子直径よりわずかに大きなナノポア (ナノサイズの細孔) を通過させる際にシークエンスを行う方法である。DNA が、ナノポアを通過する際にナノポアを流れる電流の塩基依存性からシークエンスを試みている。DNA 分子は、ナノポアをミリ秒で通過するため、実現されれば高速シークエンスが可能になる。現在までに、ポリアデニンとポリシトシンとの間で、電流変化の違いを見いだしているといった報告がある²⁾。

●DNA チップを用いる方法

DNA チップに、ある長さのオリゴヌクレオチドを全て整列して固定し、調べる DNA を蛍光標識して、チップに加える。二本鎖を形成したオリゴヌクレオチド配列は、試料 DNA 中に存在することを示しており、二本鎖形成した全てのオリゴヌクレオチドを比較して、その重なりから配列を推測するものである。問題点は、基盤に並べたオリゴヌクレオチド数の平方根に相当する長さの分子までしか配列が決められないことである。例えば、長さ 8 塩基のオリゴヌクレオチドは 65,536 種類になり、これをすべて含むチップでも

読める最大長は256塩基に過ぎない。より長い配列を決めるためには、さらに多種類の配列をチップに搭載していなければならない。チップにより多種類の配列が載せられるようになり、ハイブリダイゼーション反応の検出を電子的に行えるようになれば、将来的に実用化される可能性があるだろうと報告されている⁶⁾。

5 - 3

DNA 解析技術を支える手法

現在のシーケンサーには、解読塩基長に限界があるため、ゲノ

ムのような長大なDNAを解析する際には、解析できる長さに切断する必要がある。しかし、この切断は試験管内で行われ、順番がわからなくなるので、各断片の塩基配列を解析した後に、断片間の重複する部分をコンピュータ解析により探しだし、断片を並べ直さなければならない。この作業には時間がかかる上にミスも生じやすいなどの問題がある。この点を改善するものとしてDNA1分子（DNA1本鎖）シーケンシングに結びつく技術が報告されている。

● DNA 1分子シーケンシング

DNA 1分子（DNA 1本鎖）を物理的に直線状に固定して、末端から順番に切断し、この断片を取り出してPCR増幅し、サンガー法により配列を決定する方法が試みられている。この方法では、DNA断片を取り出した順に並べることで全塩基配列が決定できるので、塩基配列を決定した後に断片を並べ直さなくて良いという利点がある。すでに、1分子の伸長固定後、切断しそれを取り出す操作がなされたとの報告があり、また別に1分子からのPCR増幅がなされたとの報告もあるが、それぞれ単独の成果である²⁾。

6. おわりに

ゲノム解析技術は、ヒトゲノムプロジェクトがはじまった頃から、常に推進すべき課題の1つとして意識され続けてきた。米国におけるヒトゲノムプロジェクトでは、ゲノム配列解読能力の向上が、解析効率や解析コスト等に対する具体的な数値目標をもって、最終目標の1つとして挙げられていた。日本においても、1987年以降のヒトゲノム解析研究に関する種々の答申や建議において、「DNA解析技術開発を推進すべきである」等と記述されている。

実際の研究開発も、科学技術庁科学技術振興調整費において、1981～1983年に「DNAの抽出・解析・合成技術の開発に関する研究」、1984～1989年に「がん研究を支える共通基盤技術の開発に関する研究」、さらには、理化学研究所において1987～1994年に「HUGA (Human Genome Analyzer) の開発」などが行われた。

我が国において、「自動塩基配列決定装置」という概念の提唱が行われたことは画期的なことであり、また、その後、要素技術の研究開発などでも一定の成果が得ら

れ、それが実際に活用されている。しかし、現実としては、我が国の研究現場で購入されているゲノム構造解析装置は、そのほとんどが外国製である。ちなみに、外国製機器の販売シェアは、キャピラリーDNAシーケンサーで99%（2001年度、金額ベース）である⁷⁾。

最先端研究は装置開発から始まり、革新的な測定技術が新しい学問を発展させていく。つまり、自ら最新鋭の解析装置を開発する基盤を国内に持つことができれば、研究開発自体をさらに高める効果を期待できるであろう。ゲノム構造解析技術は、医薬・医療、農業・食品、化学、環境など、多岐にわたる分野に波及効果をもたらすため、この技術の進展は、広い分野の研究開発のレベルを高めることにつながるであろう。

最近、改めて解析機器の開発を推進するための取り組みが始まりつつある。バイオテクノロジーの成果を実用化・産業化し、国民生活の向上と産業競争力の強化を図ることを目的として出された、「バイオテクノロジー戦略大綱（BT戦略会議、2002年12月6日）」に

おいては、研究開発のターゲットの1つとして、「情報技術やナノテクノロジーとの連携の推進」や、「バイオツールへの重点投資」があげられている。さらに、「平成16年度の科学技術に関する予算、人材等の資源配分の方針（総合科学技術会議、2003年6月19日）」において、ライフサイエンス分野の重点事項の1つとして、「遺伝子・タンパク質の分析・計測のための先端的技術・機器」があげられている。また、文部科学省では、2003年6月より、「先端計測・分析技術開発に関する検討会」を組織し、今後推進すべき機器研究開発における実際の進め方の検討を行っているところである。

これらを受けて、今後の研究開発は、具体的に、以下の点に留意して進めるべきである。

ポストゲノム時代となり、ゲノム構造解析を中心とした研究から、ゲノム機能解析や、さらには、疾患との関連を解明して新たな医療に生かしていくといった応用研究への展開が想定されていることから、この技術には、新たな展開が期待されている。こういった状

況を踏まえると、まず、新たな原理を生み出す基礎的研究と、その成果を育てる応用研究へのサポートを継続的に行うことが重要である。

また、さらに開発段階へと進む技術に対しては、研究現場や医療現場などの応用の場面において、実際に使われる装置にまで育てあげることが大きな課題である。実際に使われる装置とするためには、研究における試薬、解析ソフト等を含めたシステムとして開発することが重要である。

謝 辞

本稿は、科学技術政策研究所において、2003 年 5 月 12 日に行われた、徳島大学薬学部教授・産業

技術総合研究所単一分子生体ナノ計測研究ラボ長、馬場嘉信氏による講演会「次世代ナノバイオデバイス研究の最前線と今後の展開」をもとに、我々の調査を加えてまとめたものである。本稿をまとめるにあたって、馬場教授には、ご指導いただくとともに、関連資料を快くご提供いただきました。文末にはなりますが、ここに深甚な感謝の意を表します。

参考文献

- 1) DOE のヒトゲノムプロジェクトのホームページ
http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html
- 2) 平野研、馬場嘉信「次世代 DNA シークエンサー」、Bio ベンチャー 2002, 2(3): 38 - 44.
- 3) Roberts et al. A History of the Human Genome Project, Science 2001, 291 (5507): 1195.
- 4) アプライドバイオシステムズジャパン株式会社のホームページ
http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index_gjsp
- 5) DDBJ ホームページ
<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>
- 6) T. A. Brown 「ゲノム 第 2 版 新しい生命情報システムへのアプローチ」メディカル・サイエンス・インターナショナル、2003
- 7) 「科学機器年鑑 2002 年版」株式会社アール アンド デイ、2002

.....